Di Sela-Sela Laboratorium dan Plot Eksperimen

MENGENAL HPLC: PERANANNYA DALAM ANALISA DAN PROSES ISOLASI BAHAN KIMIA ALAM

[Introduction to HPLC: Its Roles on Analysis and Isolation Processes of Natural Chemical Product]

Tri Murningsih dan Chairul

Laboratorium Fitokimia, Balitbang Botani, Puslitbang Biologi-LIPI, Bogor

ABSTRACT

The development of method to explore natural chemical product initially from plants were started from the beginning and generously from time to time from the conventional one's until sophisticated equipments. The value of plants as food, cosmetic and medicines resources needs specific instruments and methods for determining the quantity as well as quality of the materials in plants. This paper describe in detail one of the sophisticated equipments commonly used for analyzing and isolating bioactive compounds the so called High Performance Liquid Chromatography (HPLC).

Kata kunci / keywords: *HPLC/HPLC instrument, metode analisis/analysis method, metode isolasi/ isolation method, bahan kimia alam/ natural chemical product.*

PENDAHULUAN

Penelitian yang berkaitan dengan tumbuhan berguna Indonesia (bioprospektif) untuk pangan, kosmetika dan obat-obatan terus dikembangkan. Seiring dengan krisis ekonomi yang melanda Indonesia dalam beberapa tahun belakangan ini yang berdampak pada berbagai sektor terutama industri, antara lain disebabkan 90 % dari bahan baku, bahan pembantu dan teknologi diimport dari luar negeri. Demikian juga dalam bidang kesehatan, bahan baku obat-obatan, bahan pembantu dan teknologi hampir semuanya berasal dari luar negeri, sehingga harga obat-obatan modern menjadi tidak terjangkau oleh masyarakat umum (Chairul, 2000). Akhir-akhir ini banyak cara dilakukan oleh masyarakat melalui pengobatan alternatif yang dipromosikan melalui media cetak, selebaran maupun media elektronik. Pengobatan alternatif dengan menggunakan tumbuhan obat merupakan salah satu pilihan yang banyak mendapat sambutan positif dari masyarakat. Baik itu tumbuhan yang berasal dari Indonesia maupun dari manca negara seperti Cina, Korea dan lainnya. Penggunaan tumbuhan untuk bahan obat di Indonesia pada umumnya berdasar pada pengetahuan dan pengalaman warisan leluhur, dengan cara meramu sendiri atau membeli ramuan jadi di pasaran. Penerapan hasil penelitian sebagai dasar penggunaan tumbuhan obat masih sangat kurang. Penelitian dan usaha pengembangan dari obat-obatan tradisional terus dilakukan agar penggunaannya dapat dipertanggung-jawabkan secara medis [GBHN 1988; Loedin, 1999]. Manfaat dan khasiat dari tumbuhan obat tersebut merupakan akibat dari adanya kandungan bahan kimia yang terdapat di dalamnya yang mempengaruhi sifat fisiologis tubuh manusia atau disebut senyawa-senyawa kimia bioaktif (biologically active compounds). Senyawa-senyawa kimia tersebut merupakan produk dari proses biosintesis metabolit sekunder pada tumbuhan obat penghasilnya dan setiap jenis tumbuhan obat mempunyai kandungan kimia bioaktif *(chemical prospecting)* yang berbeda.

Untuk mengetahui keberadaan bahan kimia bioaktif tersebut baik secara kualitatif (jenis) maupun kuantitatif (kadar) dapat dilakukan dengan menganalisa senyawa aktifhya (senyawa kimia

yang mempunyai khasiat obat). Sedang untuk memperoleh senyawa aktif tersebut dapat dilakukan dengan mengisolasi senyawa aktif itu. Senyawa murni hasil isolasi itu dapat dikembangkan lebih lanjut menjadi obat-obatan modern.

Terdapat beberapa peralatan atau instrumen laboratorium yang dapat digunakan untuk melakukan analisa kualitatif dan kuantitatif maupun untuk isolasi senyawa aktif dalam tumbuhan obat. Pada kesempatan kali ini akan dibahas lebih jauh mengenai salah satu instrumen (peralatan analisis) yang canggih untuk menganalisa kandungan senyawa aktif secara kualitatif, kuantitatif sekaligus untuk isolasinya. Instrumen ini adalah "HPLC".

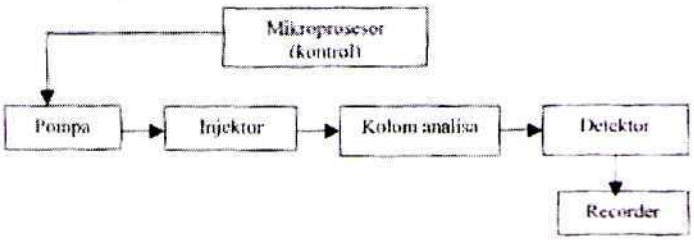
HPLC adalah kependekan dari High Performance Liquid Chromatography yang diterjemahkan dalam bahasa Indonesia menjadi "KCKT" atau Kromatografi Cair Kinerja Tinggi. Di beberapa laboratorium khususnya Laboratorium Kimia Organik, Laboratorium Kimia Bahan Alam, atau laboratorium yang berhubungan dengan bahan-bahan organik, perkataan HPLC lebih populer dibanding KCKT. Prinsip kerja HPLC adalah pemisahan dengan menggunakan tehnik kromatografi. Kromatografi berasal dari kata Yunani yaitu, chromos (warna) dan graphys (pita), sehingga kromatografi dapat diartikan sebagai pemisahan berdasarkan pada pita-pita warna dari sampel (bahan kimia) yang dipisahkan. Menurut Deyl *et al.* (1975) dalam bukunya "Liquid Column Chromatography" menyebutkan bahwa teknik kromatografi ini pertama kalinya dikembangkan oleh Tswett's (1903-1906) pada pemisahan warna pigmen dari daun. Pada tahun-tahun berikutnya pengembangan tehnik kromatografi terus berlanjut. Tehnik kromatografi kertas (paper chromatography) dikembangkan oleh Consden (1944), kromatografi cair-cair (drop counter current chromatography) dikembangkan oleh Craig (1944), kromatografi penukaran ion (ion-exchange) oleh Mayer (1947), elektroforesis oleh Haugard and Kroner (1948), kromatografi lapisan tipis oleh Ismalov (1940), kromatografi gel oleh Barrer (1945) dan kromatogafi gas oleh Claesson (1946) [Deyl *etal.* 1975].

Kromatografi merupakan cara pemisahan yang mendasarkan partisi cuplikan (sampel) antara fasa bergerak dan fasa diam. Berdasarkan sifat-sifat dari kedua fasa tersebut, maka kromatografi dapat dibedakan menjadi 5 sistem yaitu sistem kromatografi padat-padat, cair-padat, cair-cair, gas-padat dan gas-cair. Pada HPLC sistem kromatografi yang digunakan adalah cair-padat, fasa bergerak (mobile phase) berupa cairan yaitu pelarut dan fasa diam (stationer phase) berupa padatan yaitu adsorban yang terdapat dalam kolom analitik. Dengan demikian kromatografi dapat didefinisikan sebagai suatu proses migrasi diferensial di mana komponen-komponen cuplikan (sampel) ditahan secara selektif oleh fasa diam (adsorban)[Stahl, 1985; Harborne, 1987].

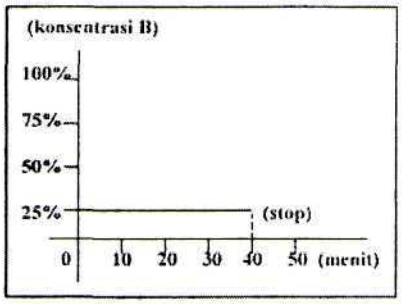
SISTEM HPLC

Berdasarkan kecanggihan (kelengkapan) perangkat alatnya sistem operasional HPLC dibedakan menjadi 2 yaitu sistem isokratik (berkelanjutan) dan gradien (berubah persatuan waktu). Sistem isokratik adalah sistem yang paling sederhana dengan perlengkapan minimum (Gambar 1), karena hanya dilengkapi dengan satu pompa maka hanya dimungkinkan menggunakan satu reservoar, sehingga apabila akan menggunakan pelarut campuran, maka pelarut hams dicampurkan terlebih dahulu sebelum dimasukkan ke reservoar; dengan kata lain pencampuran pelarut dilakukan secara manual.

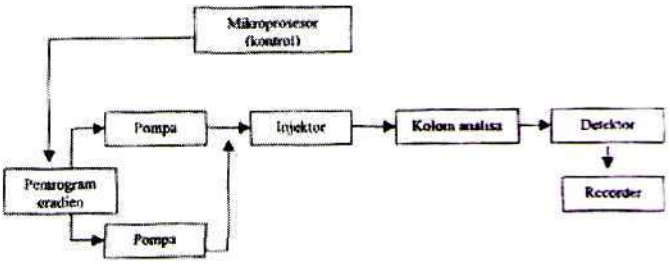
Sistem gradien dapat dilakukan pada alat HPLC yang dilengkapi dengan 2 buah pompa (Gambar 2). Dengan menggunakan 2 buah pompa, penggunaan campuran pelarut dapat diprogram perbandingannya, dimungkinkan pula menggunakan perbandingan yang berbeda sepanjang analisis. Variasi kecepatan aliran pelarutpun dapat diatur sesuai dengan kebutuhan [Willard, 1988].



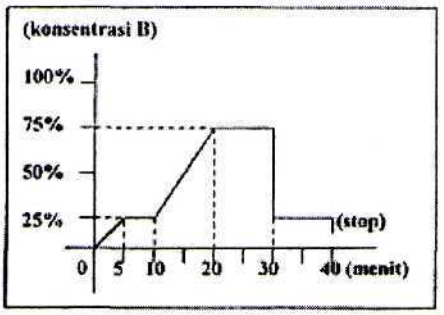
Gambar 1. Sistem Isokratik



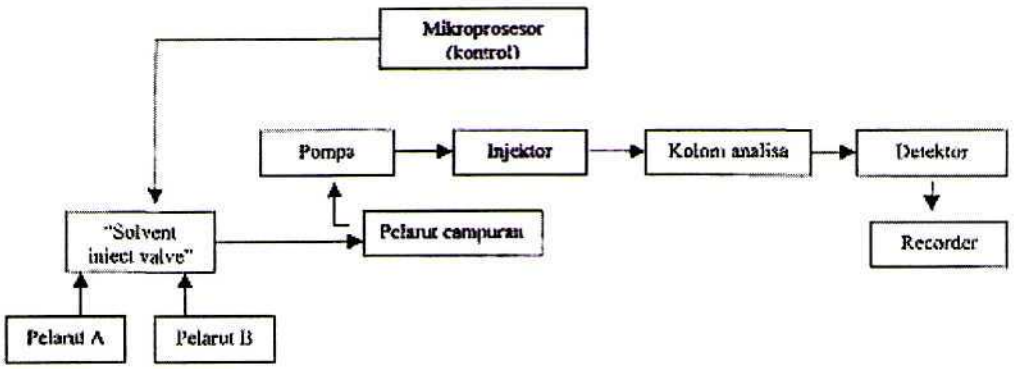
Contoh: Pemakaian komposisi pelarut pada sistem isokratik



Gambar 2. Sistem gradien



Contoh: pemakaian komposisi pelarut pada sistem gradien



Gambar 3. Sistem gradien dengan satu pompa

Dengan menambahkan satu bagian alat yang disebut "solvent inject valve" penggunaan sistem gradien dapat diterapkan pada instrumen LC yang mempunyai satu pompa (Gambar 3). Adanya alat "solvent inject valve" ini memungkinkan penggunaan beberapa reservoar dengan berbagai macam pelarut dan melalui alat ini pula dapat dilakukan pengaturan komposisi pelarut sebelum dipompa ke kolom analitik.

Recycling HPLC merupakan teknik yang baru dikembangkan dalam dasawarsa terakhir ini yaitu dengan memodifikasi sistem isokratik

maupun sistem gradien dengan cara menambah atau merubah perangkat yang pada sistem isokratik maupun sistem gradien. Perangkat yang dirubah adalah solvent inlet pada pompa dan sistem injektor/outlet. Recycling HPLC biasanya digunakan untuk pemisahan senyawa-senyawa polimer atau senyawa-senyawa yang sukar dipisahkan satu sama lainnya (karena waktu retensinya tidak berbedajauh).

PERANGKAT INSTRUMEN HPLC

Perangkat dasar instrumen HPLC terdiri dari beberapa rangkaian alat antara lain, micro prossesor, pompa yang bertekanan tinggi untuk memompakan pelarut, injektor, kolom analitik, detektor, recorder atau data prosesor yang masing-masing mempunyai fungsi berbeda. Namun bila semuanya berjalan lancar akan memberikan data yang sangat berarti dan akurat dalam analisa Vxia\itatif maupun taiantitatif ataupun iso\asi senyawa bioaktif. Dengan kemurnian yang tinggi fungsi masing-masing bagian HPLC adalah sebagai berikut (Willard, 1988):

1. Microprosesor control

Bagian ini merupakan mikro komputer, suatu bagian yang sangat penting untuk mengontrol atau membuat program mengatur kecepatan aliran pelarut (flow rate) sebagaimana yang diinginkan, mengatur tekanan (pressure), mengatur komposisi (perbandingan) pelarut, mengatur suhu injektor dan jumlah sampel yang akan diinjeksikan bila menggunakan "automatic injection", mengatur suhu oven termasuk suhu kolom, mengatur panjang gelombang pada detektor dan memprogram waktu analisa yang diperlukan apabila menggunakan HPLC sistem gradien.

2. Pompa

Alat ini dibutuhkan untuk memompakan pelarut dari reservoar ke kolom dengan tekanan paling sedikit 100 arm (1500 psi, *pound per square inch)* dan paling tinggi 400 arm (6000 psi) sesuai dengan besar aliran ("flow rate" berkisar antara 0,5-2 ml/min), tipe dari kolom, ukuran partikel adsorban dalam kolom (mesh) dan panjang kolom yang digunakan. Pompa akan bekerja memompakan pelarut secara terus menerus dengan kecepatan aliran yang tetap, sambil membawa sampel dari injektor melewati kolom analitik terus ke detektor dan akhirnya ke pembuangan. Untuk satu perangkat HPLC diperlukan satu pompa bila menggunakan sistem isokratik dan 2 pompa sesuai dengan jumlah macam pelarut yang digunakan bila menggunakan sistem gradien. Instrumen HPLC yang hanya mempunyai satu pompa dapat dioperasikan menggunakan sistem gradien apabila dilengkapi dengan alat "solvent inject valve". Alat ini antara lain terdiri dari pipa-pipa yang menghubungkan reservoar-reservoar yang berisi pelarut berbeda dengan reservoar campuran. Dengan mengatur alat ini masing-masing pelarut dapat dialirkan melalui masing-masing pipa dengan perbandingan yang dikehendaki ke teservoai campuran. Kemudian dengan menggunakan satu pompa pelarut campuran tersebut dipompokan ke kolom analitik.

3. Injektor

Injector adalah alat untuk memasukkan sampel ke dalam kolom yang dapat dilakukan secara otomatis ataupun manual. Bila alat HPLC dilengkapi dengan "automatic sample injector" maka pemasukan sample dapat dilakukan secara otomatis yaitu dengan memprogram pada "microprosesor control" jumlah sampel (uL) dan jumlah macam sampel (misalnya ada 10 macam sampel yang berbeda) yang akan dianalisa. Bisa juga dilakukan secara manual dengan cara menggunakan jarum suntik khusus, diukur volume tertentu biasanya antara 10-**20 uL Can tiarus iliKerjaKan pada sciiap saiu Xa'ii** periode pekerjaan atau pergantian sampel baru. Injektor haras mampu bekerja pada tekanan 470 arm dengan kesalahan (error) kurang dari 0,2 % dan dapat ditempatkan dalam suatu oven agar temperatur injektor dapat terkontrol. Untuk sistem ini biasanya temperatur yang dipergunakan lebih kurang 150 °C.

4. Kolom

Kolom terbuat dari logam berat , kaca dan logam stainless berbentuk tabung yang mampu menahan tekanan (setinggi 680 atm) dan tidak bereaksi dengan pelarut (fasa bergerak). Fasa diam (adsorban) dalam kolom harus halus dengan keseragaman diameter yang sama (uniform bore diameter). Kolom berbentuk tabung harus lurus dan diletakkan pada posisi vertikal serta diperlengkapi dengan fitting dan konektor yang didesain sedemikian rupa agar tidak memberikan kehampaan pada ujung kolom.

Kolom adalah bagian yang sangat penting pada HPLC, karena keberhasilan dalam analisa baik kualitatif dan kuantitatif serta isolasi bahan kimia alam sangat bergantung pada pemakaian jenis kolom yang tepat. Di dalam kolom inilah sebetulnya terjadi proses pemisahan (Gambar 4). Komponen-komponen dalam cuplikan (sampel) ditahan secara selektif oleh fasa diam (stationer phase/adsorban), kemudian terlarut oleh pelarut (fasa bergerak) yang terus menerus mengalir dan membawanya me-lewati kolom menuju ke detektor. Berbagai jenis kolom dapat digunakan sesuai dengan keperluan-nya ataupun jenis senyawa kimia yang akan dipisahkan. Jenis kolom ini dibedakan berdasar pada merk dan tipe adsorbannya (Table 1).

Panjang kebanyakan kolom antara 10-30 cm. Ukuran kolom pendek antara 3-8 cm (short, fast columns) sedang panjang kolom preparatif atau kolom isolasi pada umumnya 50-100 cm. Merurut Karger (1974), Knox (1977) dan Glajch (1983) kolom dapat diklasifikasikan berdasarkan diameter, panjang dan kegunaannya, menjadi:

Kolom Standard

Kolom standard HPLC mempunyai diameter 4-5 mm. Ini adalah kolom siap pakai yang mempunyai keseragaman ukuran partikel adsorban dan secara mekanik sangat stabil. Diameter partikel adsorban berkisar antara 3-5 r)m, kadang-kadang lebih dari 10 r|m dan ukuran yang lebih besar digunakan untuk kolom preparatif.

Kolom "Radial Compression"

Kolom ini mempunyai diameter yang lebih besar, sehingga responnya terhadap kecepatan aliran, tekanan, waktu retensi dan intensitas puncak menurun. Penggunaan kolom ini memberikan keuntungan karena akan menurunkan semua operasional HPLC seperti tekanan dan waktu analisis (bila aliran pelarut dinaikkan).

Kolom ini terbuat dari plastik (cartridge) dengan diameter 8 mm dan panjang 10 cm, diperlengkapi dengan pegangan (holder) plastik. Pemisahan akan terjadi apabila kolom mengalami tekanan dari pelarut yang dialirkan sehingga terjadi "radial compression", karena adanya lapisan gliserol di dalam kolom yang memberikan kelenturan pada dinding kolom. Setelah pemisahan selesai kolom kembali ke keadaan semula.

Kolom "Narrow-Bore"

Kolom ini terbuat dari bahan metal anti karat seperti halnya kolom standard, tetapi baik diameter maupun panjang kolom lebih kecil atau pendek dibandingkan kolom standard, dimana diameter-nya 1-2 mm dan panjangnya 5-8 cm. Penggunaan kolom ini harus diikuti dengan menggunakan pelarut yang mempunyai kualitas tinggi, karena kolom ini sangat sensitif dan akurasinya sangat tinggi. Oleh karena itu sebaiknya jumlah sampel yang diinjeksikan kurang dari 1 uL. Apabila lebih dari 1 uL akan memberikan tingkat gangguan (noise level) yang besar pada detektor dan tekanan sensitivitas akibat kelebihan konsentrasi.

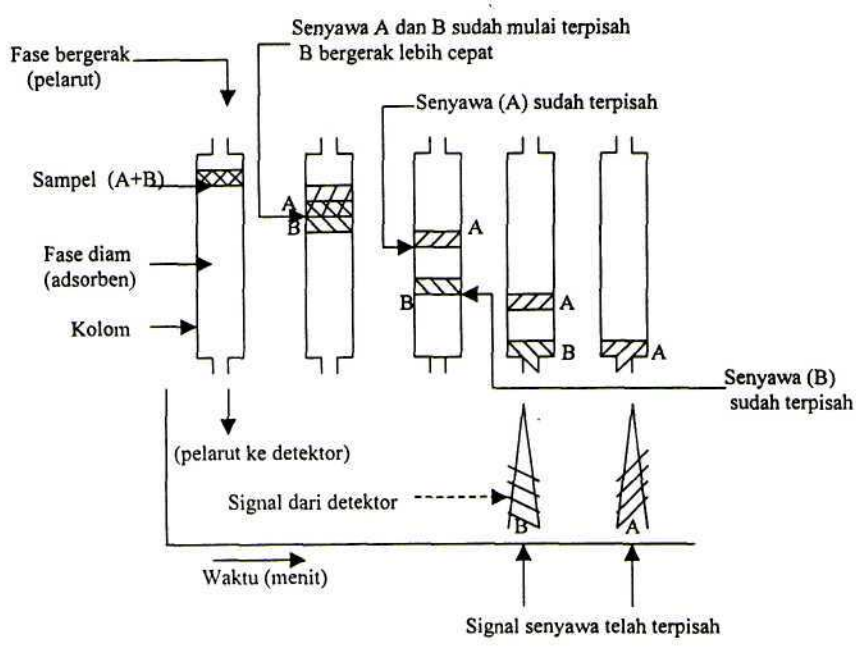
Kolom Pendek (Cepat)

Ukurannya yang pendek (3-6 cm) menyebabkan kolom ini disebut "short (fast) column". Ini sebenarnya merupakan kolom konvensional dengan diameter partikel adsorban 3 r]m dan dapat mengurangi biaya pelarut. Sampel yang dilewatkan cukup besar dan memberikan sensitivitas lebih tinggi dibandingkan kolom standard. Waktu yang dibutuhkan untuk satu kali analisis berkisar antara 15-120 detik untuk sistem isokratik dan 1-4 menit untuk sistem gradien. Kolom ini sangat baik digunakan untuk pekerjaan analitik dan kontrol kualitas (QC) [Martin, 1975].

Tabel 1. Beberapa jenis kolom berdasarkan pada adsorbannya

No.	Nama Kolom	Adsorban
1.	Ultrasil -ODS	ODS-18
2.	Ultrasil-octyl	Octyl (C-8)
3.	TJltrasil-Si	Silika
4.	LiChrosorb Si	Silika gel
5.	LiChrosorb RP-2	Hidrokarbon alifatik (C_2)
6.	LiChrosorb RP-8	Hidrokarbon alifatik (C_g)
7.	LiChrosorb RP-18	Hidrokarbon alifatik (Ci_8)
8.	LiChrosorb NH_2	Fase amino yang berikatan dengan Silika gel
9.	LiChrosorb CN	Silika gel yang mempunyai gugus -siano pada ujungnya

Sumber: Chromatography in Pharmaceutical Chemistry, Manual for the practising Chromatographer, 1978



Gambar 4. Mekanisme pemisahan pada kolom "HPLC"
Sumber : Materi kursus pengoperasian instrumen HPLC, 1999

Kolom Pengaman dan Penyaring (Guard and Filter)

Untuk memperpanjang masa pakai kolom HPLC biasanya pada pangkal kolom ditambahkan pelindung terhadap pengaruh fisika dan kimiawi yaitu kolom pengaman dan penyaring yang relatif pendek biasanya 5 cm dan berisikan fasa diam sejenis dengan kolom yang akan dilindunginya. Secara periodik isinya dapat dikeluarkan dan diisi ulang kembali untuk mengeluarkan kotoran yang berasal dari sampel yang diinjeksikan.

5. Detektor

Detektor adalah alat untuk mendeteksi komponen-komponen kimia yang telah terpisah setelah melewati kolom. Detektor yang sensitif untuk HPLC tidak bisa ditentukan. Jadi perlu dilakukan pemilihan detektor yang sesuai dengan persoalan

yang dihadapi saat itu. Untuk melakukan berbagai pemisahan atau analisis mungkin diperlukan lebih dari satu detektor yang dipergunakan secara berhubungan (seri). Menurut Roston (1982), Yang (1984) dan Frei (1985) detektor dikategori-kan menjadi beberapa yaitu

Detector RI (Refractive Index) atau disebut juga *"Differential Refractometer".*

Prinsip kerjanya adalah memonitor perbedaan "indeks refraktif' antara fasa bergerak dan larutan yang keluar dari kolom (eluent) dan akan memberikan respon untuk setiap bahan terlarut yang mempunyai indeks refraktif yang signifikan berbeda dari fasa bergerak. Alat ini paling tidak mempunyai dua kompartemen (kuvet) yang salah satunya berisikan fasa bergerak (refferen) dan yang lainnya larutan yang keluar dari kolom, sumber cahaya (monochromatic) dan dua foto detektor. Perbedaan indeks refraktif dari kedua kuvet inilah yang akan dirubah menjadi pulsa listrik yang akan diteruskan ke rekorder untuk dirubah menjadi kromatogram.

Bulk property detector

Tipe detektor ini adalah indeks refraktif yang prinsip keseluruhannya berdasarkan perbandingan pada sifat-sifat fisika dari fasa bergerak dengan atau tanpa bahan yang terlarut. Walaupun detektor ini umum dipergunakan, namun relatif kurang sensitif dan memerlukan kontrol temperatur yang baik.

Detektor *UV-Vis* (Ultra Violet -Visible)

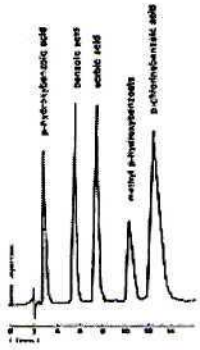
Detektor ini bekerja sangat selektif untuk setiap senyawa, sehingga dalam analisis senyawa-senyawa yang mempunyai panjang gelombang berbeda sangat sulit untuk diprediksikan golongan senyawanya. Detektor UV-Vis dapat dibagi atas 3 kategori yaitu, 1) panjang gelombang tetap (fix-wavelength), 2) panjang gelombang yang bisa dirubah-rubah (variable - wavelength) dan 3) panjang gelombang otomatis (scanning-wavelength) yang lebih dikenal dengan sebutan *"Diode Array Detector".* Alat ini paling tidak dilengkapi dengan lampu lembayung ultra (UV), biasanya digunakan lampu deuterium dengan panjang gelombang 190-400 nm dan lampu sinar tampak (wolfram) dengan panjang gelombang 400-800 nm. Prinsip kerja dari alat ini adalah sinar yang dilewatkan pada cuplikan sebagian akan diabsorpsi oleh senyawa yang ada pada cuplikan (I_o * *Λ)* yang memenuhi hukum Lambert-Beer yaitu perbedaan sinar yang datang dan sinar yang dilewatkan akan dirubah dalam bentuk pulsa listrik, sehingga memberikan sinyal (A) atau puncak-puncak pada kromatogram. Absorbansi senyawa-senyawa yang mempunyai gugus kromofor seperti polien, aromatik enol dan enon dapat diukur dengan menggunakan sinar ultra lembayung (190-400 nm), sedangkan senyawa yang tidak mempunyai gugus kromofor dapat diukur dengan menggunakan sinar tampak (400-800 nm) setelah ditambahkan pereaksi penampak warna (coloring reagent) dan diukur pada panjang gelombang warna yang ditimbulkan pereaksi. Perbandingan besar sinar yang diserap oleh larutan yang keluar dari kolom persatuan waktu (detik) inilah yang akan dirubah menjadi pulsa listrik untuk diteruskan ke rekorder menjadi kromatogram.

Solute property detector

Detektor ini erat hubungannya dengan sifat-sifat dari bahan-bahan cuplikan (analisis) yang tidak diperlihatkan oleh fasa bergerak. Detektor ini memiliki sensitivitas yang tinggi dan dapat memberikan sinyal untuk sampel dalam jumlah relatif kecil (nanogram). Ada beberapa macam detektor tipe ini yang telah dikembangkan antara lain detektor absorbansi (UV-Vis), fluoressen dan elektro-kimia (amperometric).

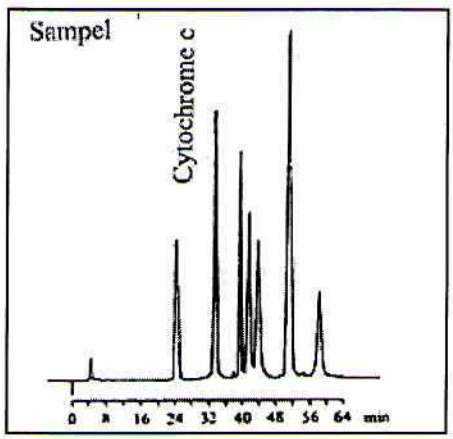
Detektor Fluorescence

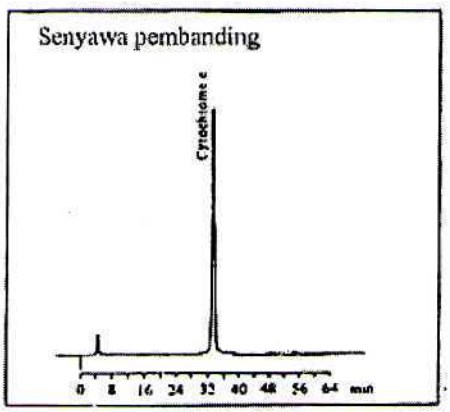
Prinsip kerja dari detektor ini adalah berdasarkan perbedaan pendar (emisi) dari senyawa-senyawa yang dianalisis, sehingga detektor ini hanya dapat digunakan secara selektif untuk senyawa-senyawa yang mengeluarkan emisi sinar atau senyawa-senyawa yang dengan pemberian energi (sinar) akan tereksitasi dan mengeluarkan emisi sinar. Jadi detektor ini tidak dapat dipakai untuk semua senyawa kimia.



Fasa diam	: LiChrosorb Rp-18, 10µm
Kecepatan aliran	: 2.0 ml/min
Volume injeksi	: lOµm
Detektor	: UV (230 nm)
Pelarut	: 20% acetonitrile /80% water
	(PH : 4.5 acetate / acetic acid buffer)
Kromatogram	: G van de Haar dan J.P Cornet

Gambar 5. Kromatogram HPLC pada pemisahan asam-asam organik
Sumber: Chromatography in Pharmaceutical Chemistry, Manual for the practising Chromatographer, 1978





Gambar 6. Kromatogram HPLC pada penentuan cytochrome c dari sampel (protein)
Sumber: High Performance Liquid Chromatography and Accessories, 1986

Detektor Elektro-kimia (Amperometric)

Prinsip detektor ini didasarkan pada karakter voltameter dari molekul senyawa yang dianalisis di dalam fasa bergerak air atau air-organik. Pengukuran dilakukan berdasarkan pada perbedaan potensial listrik dari molekul senyawa yang dianalisis dan fasa bergerak dibandingkan dengan potensial listrik dari fasa bergeraknya [Roston *et al.* 1982].

6. Recorder dan Data processing

Recorder adalah alat yang paling sederhana untuk mencatat setiap sinyal yang muncul pada detektor untuk dirubah dalam bentuk kurva atau lebih dikenal dengan kromatogram. Tinggi rendahnya kurva didasarkan pada pulsa listrik yang diterima rekorder dari detektor dan tergantung pada sensitivitas detektor yang digunakan. Kadang-kadang rekorder digabungkan dengan suatu sistem komputer untuk analisa data atau data prosesor dalam bentuk yang kompak dan dikenal sebagai *"Data Prosesor".* Ini memudahkan bagi sipemakai untuk menganalisa data hasil pekerjaannya. Informasi yang disajikan dari hasil prosessing data antara lain, waktu retensi, peak area, prosentase (%) dan jumlah total dari setiap kurva yang dihasilkan. Contoh kromatogram dapat dilihat pada Gambar 5.

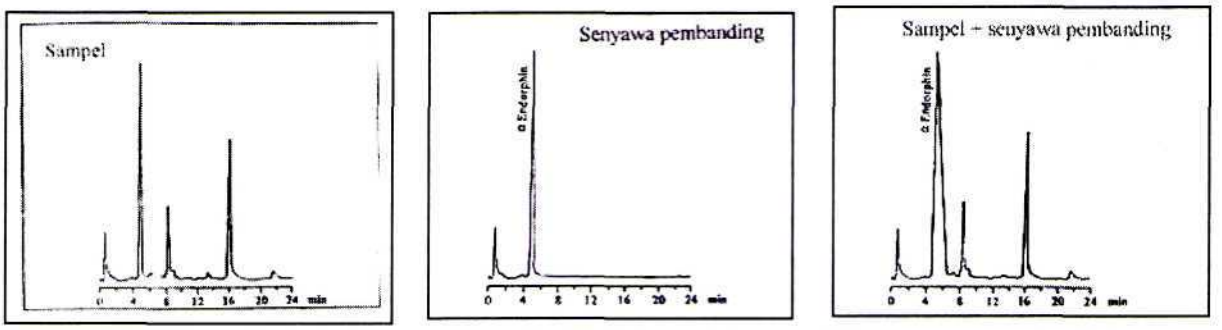
PERANANINSTRUMEN HPLC

Instrumen HPLC mempunyai peran sangat penting dalam Laboratorium kimia khususnya kimia bahan

alam, karena instrumen ini dapat digunakan untuk mengukur kandungan senyawa bioaktif yang terdapat dalam ekstrak tumbuhan, baik secara kualitatif maupun kuantitatif. Di samping itu juga dapat digunakan untuk pemurnian atau pemisahan satu senyawa dari senyawa-senyawa lainnya. Persiapan ekstraksi sampel (berupa bagian tumbuhan seperti akar, batang, daun, buah, biji dan lainnya) atau fraksinasi harus dilakukan sebelum diukur/dimurnikan dengan alat HPLC.

Pengukuran senyawa bioaktif secara kualitatif dapat dilakukan dengan menggunakan senyawa standard (senyawa yang sudah diketahui nama dan strakturnya) sebagai senyawa pembanding. Ada dua cara pemakaian senyawa pembanding, yang pertama disebut pemakaian secara *external* yaitu dengan menyuntikkan masing-masing sampel dan senyawa pembanding-nya sehingga akan diperoleh 2 buah kromatogram. Kromatogram dari sampel akan nampak beberapa puncak senyawa dengan waktu retensi (RT) yang berbeda-beda. Sedang kromatogram dari senyawa pembanding hanya akan nampak satu puncak saja dengan waktu retensi tertentu. Dengan membandingkan kedua kromatogram tersebut akan terlihat puncak senyawa yang mempunyai waktu retensi yang sama sehingga dapat disimpulkan bahwa kedua senyawa itu adalah sama. Contoh kromatogramnya dapat dilihat pada Gambar 6.

Kedua, pemakaian senyawa pembanding secara *internal* yaitu mencampur sampel dengan senyawa pembanding dan kemudian menginjeksikannya pada alat HPLC sehingga akan diperoleh satu kromatogram dengan beberapa puncak senyawa. Dengan membandingkan kromatogram sampel dan campuran sampel dan senyawa pembanding maka dapat ditentukan puncak senyawa yang dicari. Contoh kromatogram dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 7. Kromatogram HPLC pada penentuan a-endorphin dari sampel (campuran beberapa senyawa endorphin)
Sumber: High Performance Liquid Chromatography and Accessories, 1986

Dasar pengidentifikasian data retensi

karakteristik untuk setiap subtansi, yang dapat merupakan komponen utama ataupun komponen minor lainnya.

Dasar pengidentifikasian substansi ini mengikuti teori kromatografi cair-cair. Waktu retensi (t_R) pada suhu yang ditentukan mengikuti rumus :

$$t_R = \frac{L}{u}(1+k) = \frac{L}{u}\left(1 + \frac{\gamma^0_{im} M_m \rho_s \varphi_s}{\gamma^0_{is} M_s \rho_m \varphi_m}\right)$$

di mana,

L = adalah panjang kolom
U = kecepatan dari fasa bergerak
γ^0_{im} = koefisien aktivitas utama dalam fasa bergerak (Hukum Raoult)
γ^0_{is} = koefisien aktivitas dalam fasa diam
M_m = berat molekul
ρ_m = berat jenis (hubungan berat dan volume)
φ_m = area silang fasa bergerak
M_s, ρ_s dan φ_s adalah konotasi yang sama pada fasa diam.

L, u, φ_s dan φ_m adalah perubahan (dengan batas tertentu) parameter instrumen, M_m, p_m dan M_s, p_s adalah karakteristik khusus dari fasa bergerak dan fasa diam, dan hanya Y°_{im} dan y°_{is} mempunyai ciri sebagai komponen utama. Bagaimanapun juga, nilai y° adalah fungsi komposisi perpaduan, y°_{im} dan y°_{is} adalah karakteristik (I) utama dari fasa bergerak dan fasa diam. Oleh karena itu, data retensi mencerminkan kualitas dari semua komponen dalam sistem. Dengan kata lain, waktu retensi dari komponen utama yang diberikan dapat digunakan untuk mengidentifikasikan komponen utama maupun komponen lainnya.

Gas kromatografi memungkinkan kepada situasi yang lebih mudah. t_R didapat dari

$$t_R = \frac{L}{u}\left(1 + \frac{RTp_s\varphi_s}{\gamma^0_{is} f^0_i M_s \varphi_m}\right)$$

di mana R adalah konstanta gas universal, T adalah temperatur absolut dari kolom dan f^0_j adalah panas murni bahan utama (temperatur T), data retensi GLC (Gas Liquid Chromatography) mencerminkan kualitas komponen utama khusus.

***Data Pernyataan** Relatif*

Data retensi relatif yang dibutuhkan harus diekspresikan secara terpisah dalam bentuk independen dari parameter instrumen non spesifik (L, u, φ_s dan φ_m). Ini dapat diperoleh dengan melaksanakan koreksi yang cocok tetapi kadang-kadang sukar mengspesifikasikan beberapa parameter, khususnya fase bagian silang. Karena itu sangat cocok bekerja dengan data retensi relatif. Dari rasio L/u sama dengan waktu retensi tetap, t_m,

$$t_R - t_m = t_m k = t_m \frac{\gamma^0_{im} M_m p_s \varphi_s}{\gamma^0_{is} M_s p_m \varphi_m}$$

di mana t_R-t_m adalah neto waktu retensi. Sekarang jika neto waktu retensi dari komponen sesudah dianalisis (i) dibagi referensi komponen pembantu kromatografi dalam sistem dan kondisi yang sama, data retensi relatif, t_{ir}, diberikan oleh:

$$t_{ir} = (t_R - t_m)_i/(t_R - t_m)_a = \gamma^0_{im}\gamma^0_{as}/\gamma^0_{is}\gamma^0_{am} = K_i/K_a$$

di mana K; dan K_a adalah konstanta distribusi, t_{ir} sebagai fungsi temperatur dan tekanan. Oleh karena itu data retensi relatif sangat cocok digunakan apabila hasil yang didapat dalam sistem yang sama dibandingkan dengan pengaturan yang berbeda. Cara paling sederhana mendapatkan identifikasi yang sempurna dari data retensi adalah perbandingan langsung dari data retensi dari komponen yang tidak diketahui dengan tipe data retensi komponen dasar yang sama. Ini sangat jelas bahwa data retensi dari komponen yang tidak diketahui dan komponen dasar harus diteliti dalam sistem yang sama dengan kondisi serupa sehingga didapatkan perbandingan nyata.

Pengukuran senyawa secara kuantitatif juga harus dilakukan dengan menggunakan senyawa standar (senyawa pembanding). Kadar senyawa yang dicari (senyawa target) dapat dihitung dengan cara membagi luas puncak senyawa itu dengan total luas seYuruh puncak pada kromatogram. Perhitungan di atas adalah cara manual. Bila instrumen HPLC telah dilengkapi dengan alat data prosesor maka kadar senyawa dimaksud langsung tercatat pada kromatogram.

Pemumian (pemisahan) senyawa dapat dilakukan dengan penyuntikan sampel secara berulang-ulang. Suntikan sampel pertama dimaksudkan untuk melihat pola kromatogramnya. Bila pola kromatogram sudah stabil, jumlah sampel yang disuntikkan dapat diperbanyak dan dilakukan berulang-ulang. Pada setiap kali penyuntikan dilakukan penampungan "waste". Penampungan dimulai pada awal pembentukan puncak dan diakiri pada saat puncak selesai terbentuk. Penampungan dftaiyutkan pada puncak-puncak yang, lainnya dengan cara yang sama dan dilakukan pada setiap kali penyuntikan. Dengan demikian pada akhirnya diperoleh beberapa larutan senyawa tunggal dan bila pelarutnya sudah dipisahkan akan diperoleh senyawa murni.

Sesuai dengan perkembangan teknologi dalam dasawarsa terakhir ini maka HPLC juga berkembang dengan perpaduannya dengan alat-alat analisa lainnya seperti spektrometri massa (HPLC-MS) dan spektrometri infra merah (HPLC-IR). Perpaduan ini dihubungkan dengan suatu perangkat yang disebut dengan interfase menjadi suatu perangkat yang kompak. Interfase merupakan suatu perangkat di mana senyawa yang dianalisa akan diuapkan (vaporasi), sehingga terjadi pemisahan antara fasa bergerak dan senyawa yang diperiksa. Akibatnya dalam pemeriksaan selanjutnya fasa bergerak umumnya mempunyai titik didih yang rendah akan keluar lebih dahulu menuju ruang ionisasi pada MS, sedangkan senyawa kimia yang diperiksa titik lelehnya lebih besar dari fasa bergerak akan keluar kemudian, sehingga analisa dengan spektrometri-massa dapat terpisah. Dengan penggabungan kedua alat ini peranannya menjadi lebih optimal dan akurat dalam analisa bahan kimia alam ataupun analisa bahan kimia lainnya (Arpino, 1979; Blakeley, 1983; Yang, 1984; Covey, 1986).

DAFTAR PUSTAKA

Anonim. 1978. Chromatography in Pharmaceutical Chemistry, Manual for the Practising Chromatographer. *E. Merck Darmstadt,* 16-20.

Anonim. 1986. High Performance Liquid Chromatography and Accessories. *Beckman,* 87

Arpino PJ and Guiochon. 1979. LC MS Coupling, ***AnaL Chem.* 51, 683 A.**

Blakeley CR and Vestal ML. 1983. Thermospray Interfase for Liquid Chromatography/Mass Spectrometriy, *Anal. Chem.* **55,** 750.

Chairul. 2000. Socio-Economic Research Purposes (SERP-LIPI) Bahan Kimia dan Proses. Technical Service Office (TSO-LIPI), Jakarta.

Covey YR, Lee ED, Bruins AP and Henion JD. 1986. Liquid Chromato-graphy/Mass Spectromentry. *Anal. Chem.* **55,** 1451 A.

Deyl Z, Macek K and Janak J. 1975. Liquid Column Chromatography. *Elseviser Sci. Publ. Co. Oxford-New York USA,* 3-10.

DPR RI. 1988. Garis Besar Huluan Negara (GBHN) 1988.

Frei RW, Jansen H and Brinkman UA. 1985. Postcolumn Reaction Detectors for HPLC. *Anal. Chem,* 57, 1529A.

Glajch JL and Kirkland JJ. 1983. Optimization of Selectivity in Liquid Chromato-graphy. *Anal. Chem.* 55, 319A.

Gidding JC. 1965. Dynamic of Chromatography. *Dekker, New York,* Chap. 2

Harborne JB. 1987. Metode Fitokimia, Ed. II. *ITB Bandung,* 17-19.

Karger BL, Martin M and Guiochon G. 1974. Role of Column Parameter and Injection Volume on Detection Limits in Liquid Chromatograpgy. *Anal. Chem.* **46,**1640.

Knox JH. 1977. Practical Aspects of LC Theory. *J. Chrom. Sci.* 15, 352.

Loedin AA. 1999. Peran Riset Dalam Pendayagunaan Potensi Obat Tradisional Sebagai Unsur Dalam Sistem Pelayanan Kesehatan. *Disampaikan Pada Seminar Nasional Pendayagunaan Potensi Obat Tradisional Indonesia Sebagai Unsur Dalam Sistem Pelayanan Kesehatan di Jakarta.*

Martin M, Bill G, Eon C and Guiochon G. 1975. Optimization of Column Design and Operating Parameter in High Speed Liquid Chromatography. J. *Chromatogr.* ***ScL* 12.**438.

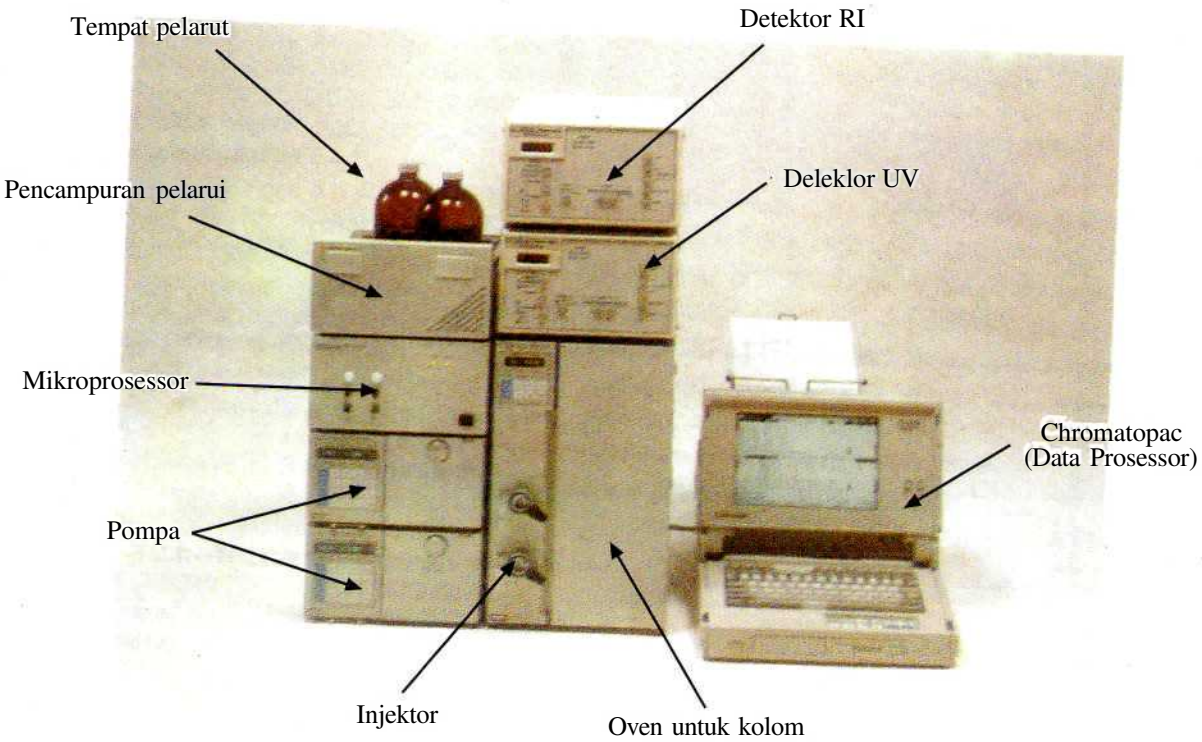
Roston D.A, Shoup RE and Kissinger PT. 1982. Liquid Chromatography/ Electrochemistry, Thin-Layer Multiple Electrode Detection. *Anal. Chem.* 54, 1417A.

Stahl E. 1987. Thin Layer Chromatography, A Laboratory Handbook 2nd. *Springer-Verlag, Berlin.*

Willard HH, Merritt LL (Jr), Dean JA, Settle FA (Jr). 1988. Instrumental Methods of Analysis 7th Ed. *Wadworth. Inc. Bellmont, California USA,* 580-613

Yang, L, Ferguson LG and Vestal ML. 1984. A New Transport Detector for High Pergormance Liquid Chromatography Based on Thermospray Vaporation. *Anal. Chem.* **56,**2626.

Catatan: Hampir semua Laboratorium Kimia Pemerintah memiliki HPLC ini.



Perangkat HPLC sistem gradien

Sumber : Katalog Shimadzu' 97 - 98